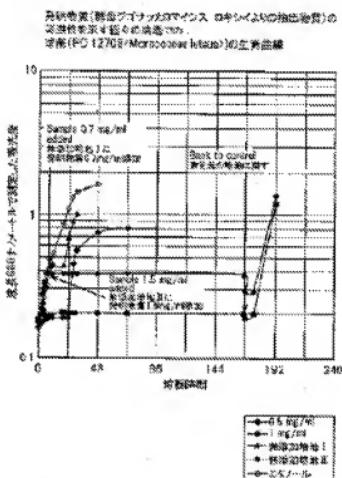


[Close](#)

Patent	JP2001218594A2 View Image
Evaluation	C (Score 2) Detail
Issued	August 14, 2001
Title	CYTOCHALASIN-LIKE SUBSTANCE, GROUP EXTRACTED FROM YEAST ZYGOSACCHAROMYCES ROUXII AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME
Applicant	TAING OK PURANZUBODO SOEIKK
Abstract	Problem to be solved: To obtain a cytochalasin-like substance group extracted from an osmotic pressure-resistant yeast <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> present in the world of nature and provide a method for producing the substance group. Solution: This method for producing cytochalasin-like substance group comprises (1) independently cultivating the yeast <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> and then extracting the cytochalasin-like substance group from the culture medium or (2) cultivating the yeast <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> in a culture medium containing a sugar, e.g. glucose or the like, followed by extracting the cytochalasin-like substance group with an organic solvent, e.g. ethyl acetate or the like, and completely evaporating the organic solvent.

Representative Drawing

Inventor	TAING OK
Appl. No.	2000073115 (2/9/2000)
IPC	C12P-017/18; A28L-003/0544; C12N-001/16; A61K-007/00; A61K-035/72; A61P-031/04; C12P-017/18; C12R-001/645; C12R-001/645;
Family	Show Known Family Members (2 patent(s))
Legal Status	Show Legal Status / Legal Status of Family Members

(10)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-218594
(P2001-218594A)

(43)公開日 平成13年8月14日(2001.8.14)

(51)IntCl'

識別記号

F I

マーク(参考)

C 1 2 P 17/18

C 1 2 P 17/18

C 4 B 0 2 1

A 2 3 L 3/3544

5 0 2

A 2 3 L 3/3544

5 0 2 4 B 0 6 4

C 1 2 N 1/16

C 1 2 N 1/16

A 4 B 0 6 5

A 6 1 K 7/00

A 6 1 K 7/00

K 4 C 0 8 3

35/72

35/72

4 C 0 8 7

審査請求 有 著要求の数 2 善面 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願2000-73115(P2000-73115)

(71)出願人 500110614

タイン オク

TAING OK

鹿児島県鹿児島市宇宿町826番地 市営住

宅4307号

(71)出願人 500110658

株式会社ブランズボード創英

東京都港区麻布十番1-4-5 深尾ビル

(72)発明者 タイン オク

鹿児島県鹿児島市宇宿町826番地 市営住

宅4307号

(74)代理人 100076727

弁理士 伊東 貞雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酵母ジゴサッカロマイシロキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*) より抽出したサイトカラシン (*Cytochalasin*) 標物質群及びその製造方法

(57)【要約】

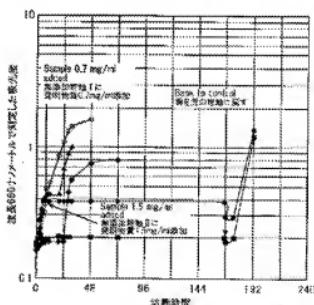
【課題】 本発明は、自然界に存在する耐熱性酵母

(*Zygosaccharomyces rouxii*) より抽出したサイトカラシン (*Cytochalasin*) 標物質群を得ること及びその製造方法にある。

【解決手段】 ①酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイを単離培養し、その培養液より抽出したサイトカラシン標物質群。②酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイをグルコース等糖の入った培地で培養した後、酢酸エチル等有機溶媒液で抽出し、その有機溶媒液を完全に飛ばしたサイトカラシン標物質群の製造方法。

発明の範囲(発明がなされたいす、ロキシイの抽出物質)の可逆性を示す種々の培地での

結果(FD 12709 <Microcosm Media> の生長曲線)



- 0.5 mg/ml
- ▲ 1 mg/ml
- ◆ 1.5 mg/ml
- 2 mg/ml
- △ 2.5 mg/ml

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*) を単細胞化し、その培養液より抽出したサイトカラシン (*Cytoclasin*) 脱酵素質。

【請求項2】 酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイをグルコース等糖の入った培地で培養した後、酵酸エチル等有機溶媒液で抽出し、その有機溶媒液を完全に飛ばしたサイトカラシン様代謝物群の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】 本発明は、自然界に存在利用される酵母浸透圧性酵母 (*Z. rouxii*) より抽出したサイトカラシン様物質を得ること及びその製造方法に関するもの。

【0 0 0 2】

【従来の技術】 後來、ジゴサッカロマイシス ロキシイは食品腐敗原因の一つとされており、この酵母の利用法はまだ気明さなかった。一方、1960年代英國の科学者によって初めて発見されたサイトカラシン物質は可逆性を持ち、抗菌性を得、動物細胞の分裂を抑制する効果などが確認されている。しかし、従来発見されたサイトカラシン物質群は全てカビ類だけに存在してい。

【0 0 0 3】

【発明が解決しようとする課題】 「カビ類」はその性質上変性しやすく安全で安定した繁殖や取扱いが難しく、生産設備も高額となるが、「酵母類」は変性し難く安全で安定した繁殖をさせられ生産設備も低廉であり、何よりも「カビの毒性」の有無を心配する必要がない。サイトカラシンやサイトカラシン様物質は初期に発見されたサイトカラシンAやBから現在サイトカラシンWまで発見されてきており、夫々独自の機能を持つ物質として色々な分野で利用されている。その一群はまだ新物質の存在の可能性が高く、従来触れていない微生物を利用して生産できる方法が必要である。抗生素や抗腫瘍性物質の分野でもカビ類から抽出し、既に市場に出售っている薬品に対して強い病原菌等が現れてきており、新薬品の開発が要求されているという問題点があった。

【0 0 0 4】

【課題を解決するための手段】 本発明は上記問題点を解決することを目的とし、①酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイを単細胞化し、その培養液より抽出したサイトカラシン様物質。②酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイをグルコース等糖の入った培地で培養した後、酵酸エチル等有機溶媒液で抽出し、その有機溶媒液を完全に飛ばしたサイトカラシン様代謝物群の製造方法を特徴としている。

【0 0 0 5】

【発明の実施の形態】 本発明はジゴサッカロマイシス ロキシイを糖の入った培地で培養する。培地は普段酵母を培養する時の培地で、糖はグルコース、スクロース、マルトース等である。

【0 0 0 6】 培地の糖濃度は2%から4.0%までである。

【0 0 0 7】 培地のpHは4から7までである。

【0 0 0 8】 培養温度は10°Cから35°Cまでである。

【0 0 0 9】 培養時間は1日から7日までである。

【0 0 1 0】 培養後の上澄みの収穫は遠心機にかけることによるものである。

【0 0 1 1】 代謝物の抽出法は有機溶媒液を利用するこ

とである。

【0 0 1 2】 上述の有機溶媒液は酵酸エチル、クロロブ

オーム等である。

【0 0 1 3】 その後の操作は溶媒液を完全に飛ばし、得られた物質をエチルアルコールやクロロフォーム等に溶かしてジゴサッカロマイシス ロキシイから生産された代謝物として収穫する。

【0 0 1 4】

【発明の効果】 上述の方法で、ジゴサッカロマイシス ロキシイを培養することによって回収できる末端型代謝物群の量は培地1L当たり1.0g～1.6gである。

【0 0 1 5】 表1はPaper disc方法を用いて8菌種の細菌に対する抗菌性の検討をした結果を示す表である。

【表1】

発芽物質(酵母ジゴサッカロマイシス ロキシよりの抽出物質)の
ペーパーディスク法による抗菌効果

【使用細菌リスト】

枯草菌 IFO 13719 <*Bacillus subtilis*>
 大腸菌 IFO 3301 <*Escherichia coli*>
 シトロバクター属 <*Citrobacter freundii*>
 コリネバクテリウム属 <*Corynebacterium aquaticum*>
 球菌の一類 IFO 12708 <*Micrococcus luteus*>
 サルモネラ腸炎菌 IFO 3213 <*Salmonella enteritidis*>
 ブドウ球菌 IFO 14462 <*Staphylococcus aureus*>
 緑膿菌 IFO 12699 <*Pseudomonas aeruginosa*>

ディスクの直径 = 6 mm

供試物質	枯草菌 1.4 mg	殺菌活性領域の直径 (mm)							
		大腸菌 1.0 mg	シトロバクター属 0.5 mg	球菌の一類 0.5 mg	サルモネラ腸炎菌 1.0 mg	ブドウ球菌 1.0 mg	緑膿菌 0.5 mg	サルモネラ腸炎菌 2.0 mg	ブドウ球菌 2.0 mg
発芽物質 2.1 mg	13	9	9	15	12	13	7	9	
2.8 mg	15	9.5	10	17	14	14	7	9.5	
エタノール 2.0 ml	-	-	-	-	-	-	-	-	

- : 効果なし

【0016】実験方法はシャレーに普通の寒天培地を入れ、その上面に菌を播種したソフトアガー(0.5%寒天)培地をまいた後、その上に*Z. rouxii*から抽出した本発芽物質(以下、サンプルと書く)および対照物のつけた Paper disc を載せて30°Cで一晩培養し、disc の周りに現れる透明直径を測った方法である。サンプルは既にアルコールに溶かしており、その対照物としては純アルコールを利用した。拮抗性がかかるdiscの周りに菌が繁殖せず、透明になる論理である。その結果、対照物エタノールでは効果が全くなかったのに対し、サンプルではサンプルの量を増やすほど効果が強くなったことが分かる。

【0017】図1は*Bacillus licheniformis* (バチルス、糸状菌の一類)に対する拮抗性を示す図である。実験方法は試験管の中に普通の液体培地を入れサンプル濃度を1.8 mg/ml、3.5 mg/mlとなるように添加した。サンプルの入っていない(濃度0 mg/ml)ものを対照とした。それぞれに對象菌を播種して30°Cで12時間培養し、菌の生長を吸光度で測った生長曲線である。(a)のグラフは培地のpHを5.5に調整したもので、(b)のグラフはpHを6.0に調整したものである。その結果、pH 6.0よりpH 5.5で菌の生長がはつきりと抑制されたことが分かる。pH 5.5でサンプルの濃度が3 g、5 mg/mlに

なると菌は全く繁殖しなかったことが分かる。

【0018】図2は*Escherichia coli* (大腸菌)に対しての拮抗性を示す図である。実験方法は図1と同様でpH 5.5での結果を表わしている。サンプルの濃度を2.0 mg/mlにした場合pHを5.5に調整したものにも無調整のもの(pH 4.6)にも効果があることが分かる。

【0019】図3は*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)に対する拮抗性を示す図である。実験方法ならびに結果は図2の大腸菌と同様である。

【0020】図4(a), (b)は*Salmonella enteritidis* (食中毒を引き起すサルモネラ腸炎菌)に対する拮抗性を示す図である。実験方法は図1と同様で、(a)はpH 5.5、(b)はpH 6.0での生育グラフである。pH 6.0よりpH 5.5で菌の繁殖および生長が共に抑えられたことが分かる。

【0021】図5は*Micrococcus luteus* (球菌の一類)に対するpH 5.5での拮抗性を示す図である。実験方法は図1と同様であるが培養時間を24時間までした。サンプルの入っていない対照に対し、サンプル濃度2 mg/ml入った試験管には菌が24時間経っても繁殖しなかったことが分かる。

【0022】図6は*Staphylococcus a*

ureus (ブドウ球菌) に対して pH 5. 5 での抗菌性を示す菌である。実験方法は図 1 と同様である。サンプルを 2 mg/m^l 入れて無調整 pH の 4. 6 のときでも pH を 5. 5 に調整したときでも菌は 24 時間まで繁殖する。

繁殖せしサンプルの効果があるということが分かる。

【0023】表 2 は本発明物質群の各細菌における生育抑制最低濃度 (MIC) を示す表である。

【表 2】

発明物質(酵母グロサッカロマイシス ロキシよりの抽出物質)の
細菌生育抑制最低濃度

細菌名	生育抑制最低濃度 mg/m ^l		
	pH 制御なし	pH 5. 5	pH 6. 0
(グラム陽性細菌)			
枯草菌 IFO 10719 < <i>Bacillus subtilis</i> >	1~2	4~6	>5
バチルス、芽胞の一株 < <i>Bacillus tosei</i> >	1	2~3	>5
腸球菌 IFO 12508 < <i>Clostroccus faecalis</i> >	2	>4	NT
芽胞の一株 IFO 12708 < <i>Clostroccus tetanii</i> >	1~2	2	>4
サルモネラ鳥糞菌 IFO 3013 < <i>Salmonella enteritidis</i> >	0.7	1	2~3
ブドウ球菌 IFO 14465 < <i>Staphylococcus aureus</i> >	1~2	3	NT
(グラム陰性細菌)			
大腸菌 IFO 3201 < <i>Escherichia coli</i> >	2	>4	NT
銅綠菌 IFO 12689 < <i>Pseudomonas aeruginosa</i> >	1	1	NT

NT : 無効

【0024】この表は図 1~図 6 に示した抗歯性実験を各菌に対して行った結果をまとめたものである。細菌はグラム陽性、グラム陰性と大別してある。各菌に対して生育抑制最低濃度 (MIC) を無調整の pH、pH 5. 5、pH 6. 0 にて表わしてある。pH を調整しなければ少量でサンプルの抗歯性が見られ、このサンプルの効果は pH を下げるほど共に現れると言える。無調整の pH での生育抑制最低濃度 (MIC) はサルモネラ菌で 0.7 mg/m^l、ブドウ球菌で 1~2 mg/m^l である。大腸菌で 2. 0 mg/m^l である。

【0025】図 7 は *Micrococcus luteus* (細菌の一株) におけるサンプルの抗歯性が可逆的であることを示す図である。実験方法は図 1 と同様である。サンプルの濃度を 0. 5 mg/m^l と 1 mg/m^l にした。対照としてはエタノールを 2.0 μl/m^l になるように加えた。また無添加の普通の培地も Control 1, Control 2 として使った。エタノールを加えた試験管には菌は通常通り生育し、4~8 時間培養後生菌のピークを迎えた。サンプルを 0. 5 mg/m^l 加えた試験管には 24 時間まで菌の生育が抑制されたものの 2.4 時間後には弱いながら繁殖してきた。それに対し、サンプルを 1. 0 mg/m^l 加えた試験管には菌が 16.8 時間経っても育成しなかった。Control 1 と Control 2 の試験管では菌の生育は共に通常

であった。それらを 12 時間培養して菌の数を増やしてからサンプルを 0. 7 mg/m^l と 1. 5 mg/m^l なるようそれぞれ入れた。菌の数が増えている培地にサンプルを 0. 7 mg/m^l 加入すると (Control 1) 生育は数時間抑えられた後通常に上がってきた。一方サンプルを 1. 5 mg/m^l まで入れたら (Control 1 II) 数の増えた菌も 16.8 時間以上止めて生育が抑制された。その Control 1 II 試験管とサンプルを最初から 1. 0 mg/m^l 加えた試験管を培養時間 16.8 時間に無菌的に分け、培地を遠心分離して細胞を取り出し、無菌水で 2 回洗ってから普通の培地に戻して培養を行った。その結果、両方共菌が通常通り生育してきたことが見られた。結論として下記の点が挙げられる。

(1) 本発明の物質群は最も濃度を高めれば増えた数にも対応できる。

(2) 本発明の物質群はその使用量によって菌の発生を長時間抑制できる。

(3) 本発明の物質群の効果は可逆的で、菌を元の培地に戻すと通常に生育する。

【0026】図 8 は *Micrococcus luteus* (細菌の一株) の生育に及ぼすサンプルの影響を示す累積差動鏡写真である。

(1) の写真是 *Micrococcus luteus*

菌を通常の培地で12時間培養後に撮ったものである。菌は通常通り生長し、細胞分裂も通常に起こっていることがわかる。

(b) の写真は培地にサンプルが2.5mg/ml入ってて同じく12時間培養後に撮ったものである。菌の細胞が膨張している上、分裂も完全にせず二つの細胞がくっついていることが分かる。

【0027】図9(a)の写真はEscherichia coli(大腸菌)、(b)の写真はSalmonella enteritidis(サルモネラ腸炎菌)それぞれの生育に及ぼすサンプルの影響を示す電子顕微鏡写真である。両方共サンプルを2.5mg/ml入れた培地に菌を12時間培養後に撮った写真でどちらにも菌の細胞壁が膨張し一部が突き出ていることが分かる。

【0028】応用の具体性を下記に記す。食品分野では① 菌殺、本産物への「抗生物質」使用は、O-157菌、サルモネラ菌の糞便害化を促す要因となるが「発明物質」を餌に加えることで、「菌殺効果を防止し、害菌の増殖」が防げる。農薬使用の軽減可能。

② 現在約130種類の食品添加剤が認可され食品分野に用いられるが、その主体である「抗生物質」が「発明剤」の使用で安全にできる。

③ 第1次産品の食材の保存で、主体となる「細胞繁殖防止剤」を用いるが「発明剤」で安全な腐敗防止が可能となる。化粧品分野では

④ トイレタリー分野の「殺菌剤」は必ずしも人体にとって無害でないものが含まれるが、安全で肌に相応しいpHの殺菌効果の「洗浄剤」ができる。

⑤ 肌に付着させる様々な化粧品の品質保持成分も、必ずしも安全で刺激性が無いと言えない。「発明剤の添加」でこの問題が解決できる。医薬品分野では、

⑥ AからWまで概に発見、発明された物質は全てカビ類からつくるもので、非常に高価なもの。酵母からつくることで安全で安価な新しい「抗生物質」の生産ができる。

⑦ 細胞の分裂(増殖)を抑制する機能は、ガン細胞、エイズウイルス、腫瘍細胞などの分裂、増殖を抑制する可能性を持つ分野。

⑧ 本発明が病原菌の繁殖を抑制することはデータや写真にあるように明らかであり、更に「自己免疫療法」による自然治療法が期待される分野。

【0029】サイトカリン様物質群(全く同じ構造か全く似た性状の物質群が定かでない)は全てカビ類から抽出していた。医療分野でも既にこれまで様々な可能性を持っている。しかし、本発明は「酵母起源」で初めての物質として抗生物質、細胞分裂抑制機能とその可逆性を立証して、広い範囲の「食品」に先ず応用できることが特徴であり、化粧品、医薬品へと付加価値の高い分野へ利用できる。

【技術的簡単な説明】

【図1】Bacillus toyoi(バクテルス、棒菌の一種)に対しての抗生物質を示す図である。

【図2】Escherichia coli(大腸菌)に対しての抗生物質を示す図である。

【図3】Pseudomonas aeruginosa(緑膿菌)に対しての抗生物質を示す図である。

【図4】(a)、(b)はSalmonella enteritidis(食中毒を起すサルモネラ腸炎菌)に対しての抗生物質を示す図である。

【図5】Micrococcus luteus(球菌の一種)に対してpH5.5での抗生物質を示す図である。

【図6】Staphylococcus aureus(ブドウ球菌)に対してpH5.5での抗生物質を示す図である。

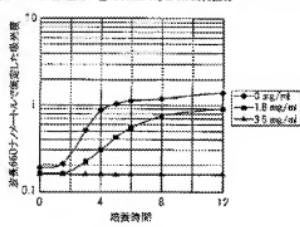
【図7】Micrococcus luteus(球菌の一種)におけるサンプルの抗生物質が可逆的であることを示す図である。

【図8】発明物質(酵母ジゴサッカロマイシス・ロキシよりの抽出物質)の菌株(IFO 142708(Micrococcus luteus))に及ぼす影響を示す電子顕微鏡写真で、(a)は通常の培地で12時間培養後、(b)は発明物質2.5mg/mlの入った培地で12時間培養後に撮ったものである。

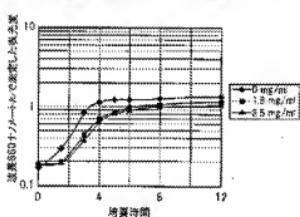
【図9】(a)は発明物質(酵母ジゴサッカロマイシス・ロキシよりの抽出物質)2.5mg/mlの入った培地で12時間培養後に撮影した大腸菌(IFO 3301(Escherichia coli))の電子顕微鏡写真、(b)は発明物質(酵母ジゴサッカロマイシス・ロキシよりの抽出物質)2.5mg/mlの入った培地で12時間培養後に撮影したサルモネラ腸炎菌(IFO 3313(Salmonella enteritidis))の電子顕微鏡写真である。

【図1】

(a)
pH5.0における発酵物質(酵母ジゴリック酸マインス、ロキシイよりの抽出物質)の濃度別のペルス(浮遊の一藻: *Bacillus toyoi*)の生育曲線

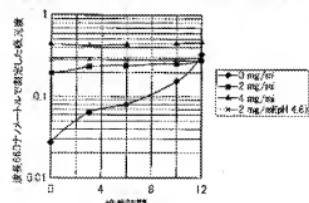


(b)
pH5.0における発酵物質(酵母ジゴリック酸マインス、ロキシイよりの抽出物質)の濃度別のペルス(浮遊の一藻: *Bacillus toyoi*)の生育曲線



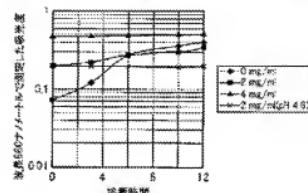
【図3】

pH5.0における発酵物質(酵母ジゴリック酸マインス、ロキシイよりの抽出物質)の濃度別の発酵度(FD 12689 (*Pseudomonas fluorescens*))の生育曲線



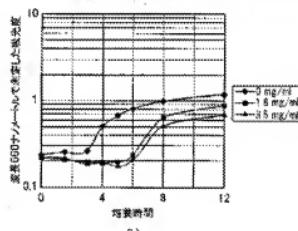
【図2】

pH5.0における発酵物質(酵母ジゴリック酸マインス、ロキシイよりの抽出物質)の濃度別の大腸菌(FD 3301 (*Escherichia coli*))の生育曲線

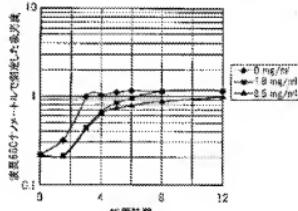


【図4】

pH5.0における発酵物質(酵母ジゴリック酸マインス、ロキシイよりの抽出物質)の濃度別のサムモラテクノサッカロマインス(FD 3313 (*Salinibacter marinorile*))の生育曲線

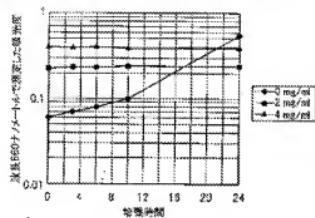


pH5.0における発酵物質(酵母ジゴリック酸マインス、ロキシイよりの抽出物質)の濃度別のサムモラテクノサッカロマインス(FD 3313 (*Salinibacter marinorile*)))の生育曲線



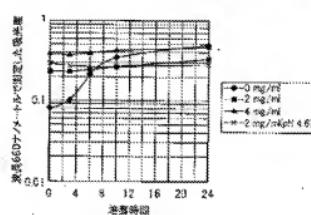
【図5】

pH5.5における免疫物質(酵母ジオサッカロマイシン、ロキシイよりの抽出物質)の濃度別の培養(FD 12708<*Micrococcus luteus*>)の生育曲線



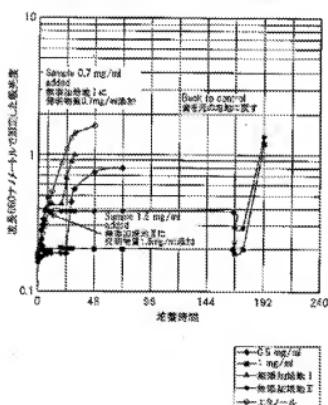
【図6】

pH5.5における免免疫物質(酵母ジオサッカロマイシン、ロキシイよりの抽出物質)の濃度別の培養(FD 14462<*Stachylococcus sphaericus*>)の生育曲線



【図7】

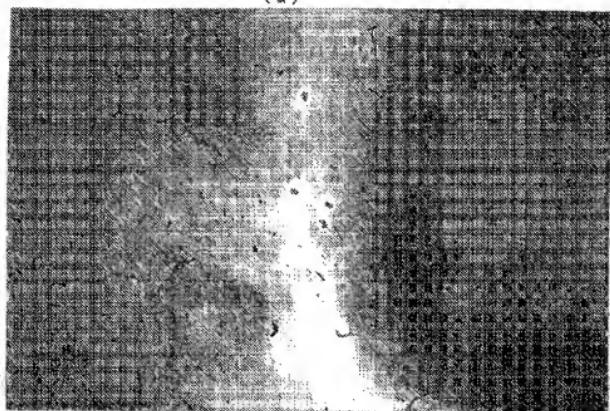
免免疫物質(酵母ジオサッカロマイシン、ロキシイよりの抽出物質)の可逆性を示す著者での確認(FD 12708<*Micrococcus luteus*>)の生育曲線



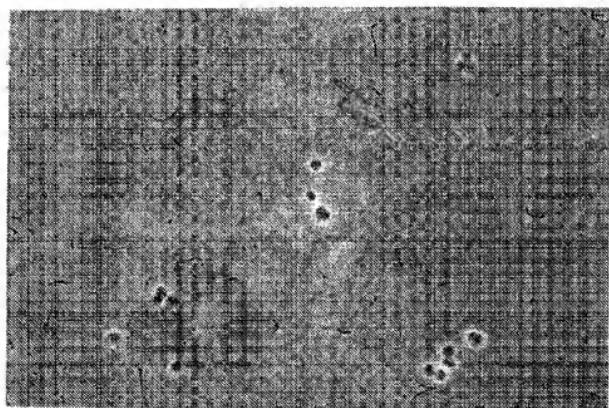
【図8】

“圓面代用写真”

(a)



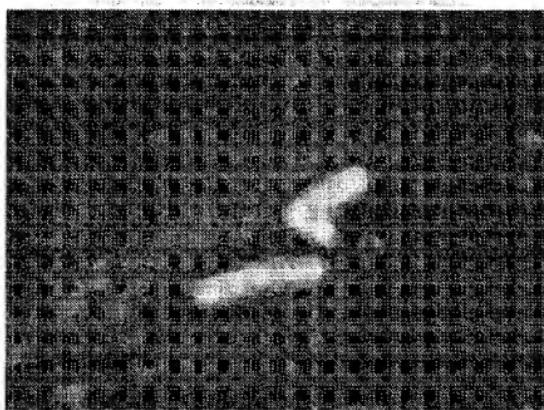
(b) ...



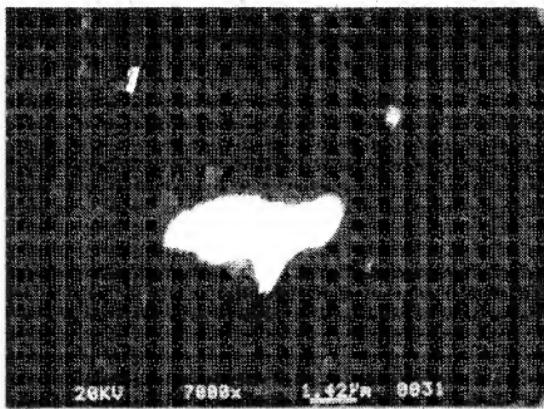
【図9】

表面代用写真

(a)



(b)



フロントページの読込

(5) Int. CL ¹	識別記号	F I	リード(参考)
A 6 1 P 31/04		A 6 1 P 31/04	
(C 1 2 P 17/18		(C 1 2 P 17/18	C
C 1 2 R 1:645)		C 1 2 R 1:645)	
(C 1 2 N 1/16		(C 1 2 N 1/16	A
C 1 2 R 1:645)		C 1 2 R 1:645)	

Fターム(参考) 4B021 MC01 MC27 MP01 MP02
 4B064 AE48 BE07 BE14 CA06 CE08
 DA01 DA10 DA11
 4B065 AA72X AC07 AC14 AC15
 BA22 BD16 CA18 CA11 CA44
 CA50
 4C093 AA031 BB48 CC01 CC23
 EE01 FF01
 4C087 AA02 AA04 AA05 BC12 CA11
 RA14 ZB07 ZB21 ZB26 ZB33
 ZB35